

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390198

研究課題名(和文) FGF2とVEGF遺伝子の新たな機能：機能性RNAによるアバスチン抵抗性の誘導

研究課題名(英文) A novel functions of FGF2 and VEGF gene products: induction of resistance to antiangiogenic treatment

研究代表者

近藤 茂忠 (KONDO, Shigetada)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：40304513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：多くの固形がんでがん細胞はVEGF阻害薬に対する耐性を獲得するがその仕組みはよく解っていない。本研究ではVEGF阻害薬抵抗性を司る分子機構の一端を解明した。血管新生阻害治療によって誘導される2つの新規ncRNAとその誘導メカニズムを明らかにした。これらncRNAsはp53の発現と機能を抑制した。その結果、血管新生阻害治療ストレスに対する適応(HIF-1の過剰活性化、血管新生因子発現のスイッチング、細胞死の回避、細胞周期停止異常、癌幹細胞様形質の獲得)を誘導した。ヒト大腸がん組織および転移肝組織において、これらncRNAはアバスチン治療群で高発現していたが、未治療群では発現していなかった。

研究成果の概要(英文)：VEGF-targeted therapies have become an important treatment for a number of human malignancies. The VEGF inhibitors are actually effective in several types of cancers, however, the benefits are transiently, and the vast majority of patients who initially respond to the therapies will develop resistance.

I elucidate that one of mechanisms for the acquired resistance is the direct effect(s) of VEGF inhibitors on tumor cells expressing VEGF receptors. Treatment with bevacizumab and 5-FU induced two novel non-coding (nc)RNAs. These ncRNAs silenced p53 expression and inhibited p53 function. As the results, these ncRNAs induced malignant phenotypes in colon cancer cells, including over-activation of HIF1, angiogenic switching, resistance of apoptosis, aberrant cell cycle regulation, cancer stem-like phenotype, and resistance to bevacizumab. I revealed expression profiles of these ncRNAs in colon cancer patients; these ncRNA was overexpressed in patients treated with bevacizumab.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：血管新生阻害 VEGF FGF2 ノンコーディングRNA 悪性進展

1. 研究開始当初の背景

多くの固形がんで、がん細胞は機能的 VEGF 受容体を発現しているが、VEGF 標的治療薬が直接がん細胞自身に与える影響は良く解っていない。

また、現在 VEGF/VEGF 受容体を分子標的とした数多くの血管新生阻害薬が開発されている一方で、がん細胞はこれら VEGF 阻害薬に対して抵抗性を獲得し、その結果さらに悪性化してしまうことが大きな問題となっている。この VEGF 阻害薬抵抗性と悪性化を司る、がん細胞内の分子機構は未解明の重要問題である。

2. 研究の目的

本研究では、VEGF 標的薬と抗がん剤により活性化される「悪性腫瘍化 RNA プログラム」を解明し、このプログラムによるがん細胞と腫瘍間質細胞の悪性化の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Vegf ncRNA, Fgf2 ncRNA の転写制御

各遺伝子のエクソン 1 領域をクローニングし、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に組み込んだプラスミドを作製。候補転写因子を siRNA でノックダウンして、各 ncRNA プロモーター活性に及ぼす影響を、ルシフェラーゼ・レポーター mRNA の発現量を指標にして評価した。

(2) 変異型 p53 が Vegf ncRNA, Fgf2 ncRNA 発現に及ぼす影響

変異型 p53 発現プラスミド(175His, 248Pro, 273Pro)を過剰発現した時の各 ncRNA プロモーター活性解析とその発現(ノーザンプロット解析)を行った。

Vegf ncRNA による変異型 p53 mRNA のサイレンシングを、p53 欠損 HCT116 細胞に各変異型 p53 発現ベクターと Vegf ncRNA を共発現させて、p53 のノーザンプロット解析を行った。

(3) p53 アイソフォーム発現および誘導遺伝子の発現解析

Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA 発現細胞における p53 アイソフォーム(d133-p53)の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。

p53 誘導遺伝子の発現は、アポトーシス関連(Bax, PUMA, Noxa)血管新生促進遺伝子(VEGF, HIF-1a, EG-VEGF, Endoglin, FGF-2,

FGF-BP1, Cox-2)を定量 PCR 法で解析した。

(4) 悪性化形質の解析

Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA による p53 抑制の結果、誘導される悪性化形質について、1)各抗がん剤および低酸素によるアポトーシス抵抗性(TUNEL 染色法)、2)がん幹細胞様形質については、大腸がん幹細胞マーカー遺伝子である CD133 と CD166 の発現解析とスフェロイド形成能、3)運動能と浸潤能を解析した。

(5) 低酸素応答の解析

VEGF 阻害による低酸素ストレスと VEGF 枯渇ストレスが HIF-1 α の発現と活性化に及ぼす影響について、HIF1 の転写活性と、HIF1 の標的遺伝子を搭載した PCR アレイで解析した。

(6) ヒト腫瘍組織での Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の発現解析

大腸・直腸がん組織と肝転移組織における Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の発現を蛍光 RNA-FISH 染色で解析した。

4. 研究成果

(1) Vegf ncRNA, Fgf2 ncRNA の転写制御機構

Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の転写を制御するプロモーター領域を特定した(Vegf ncRNA は、VEGF Exon 1 の+1 - +600 の領域、Fgf2ncRNA は FGF2 Exon 1 の+1 - +550 の領域)。Vegf ncRNA の転写活性化に重要な転写共役因子として、PGC1a および転写活性化因子として PPAR γ を同定した。Fgf2 ncRNA の転写活性化に重要な転写活性化因子として AP-1 を同定した。これらの転写因子は VEGF 標的薬アバスチンによって転写活性化能が亢進することも明らかにした。

(2) 変異型 p53 が Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の発現に及ぼす影響

野生型 p53 は VEGF mRNA と FGF-2 mRNA の転写を抑制し、その結果、Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の転写が活性化するのに対し、多くの固形がんで共通する変異型 p53(175His, 248Pro, 273Pro)は、VEGF mRNA と FGF-2 mRNA の転写を強く活性化した。その結果、転写干渉作用によって Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の転写は抑制されることを見出した(図 1)。

一過性遺伝子導入実験では、Vegf ncRNA は変異型 p53 mRNA もサイレンシングできた。また、Fgf-2 ncRNA と変異型 p53 の結合について解析した結果、Fgf-2 ncRNA は変異型 p53 と結合できないことが分かった。この結果は、Fgf-2 ncRNA は野生型 p53 のみを特異的に阻害することを意味している。

(3) Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA が、がん細胞の悪性形質変化に及ぼす影響

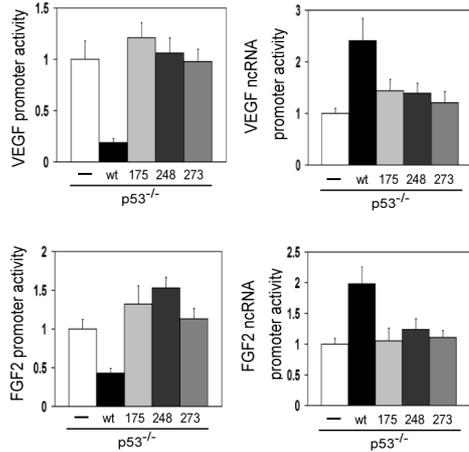


図1 各ncRNA転写に及ぼす野生型、変異型p53の影響

p53 により誘導されるアポトーシス促進遺伝子 (Bax, PUMA, Noxa) の発現が抑制されており (図3)、各種抗がん剤 (5-FU, irinotecan, cisplatin) および低酸素によるアポトーシスが著しく低下していた (図2)。一方、p53 により発現が抑制されている血管新生促進遺伝子 (VEGF, HIF-1a, EG-VEGF, FGF-2, FGF-BP1, Cox2) の発現が有意に増加していた (図3)。

がん幹細胞様形質の獲得について検討した結果、HIF-1a の発現増加と活性化、スフェロイド形成能の著明な増加と、遊走能と浸潤

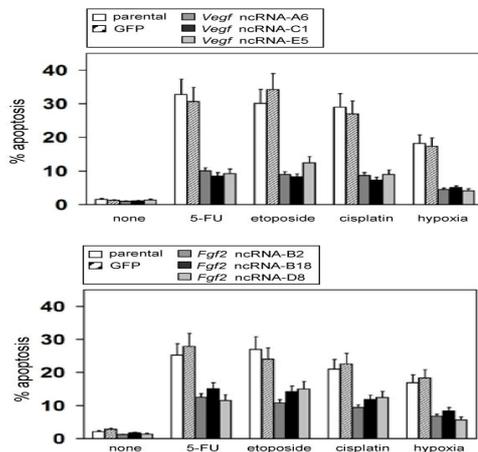


図2 p53により誘導されるアポトーシス

能の亢進が認められた (図4)。

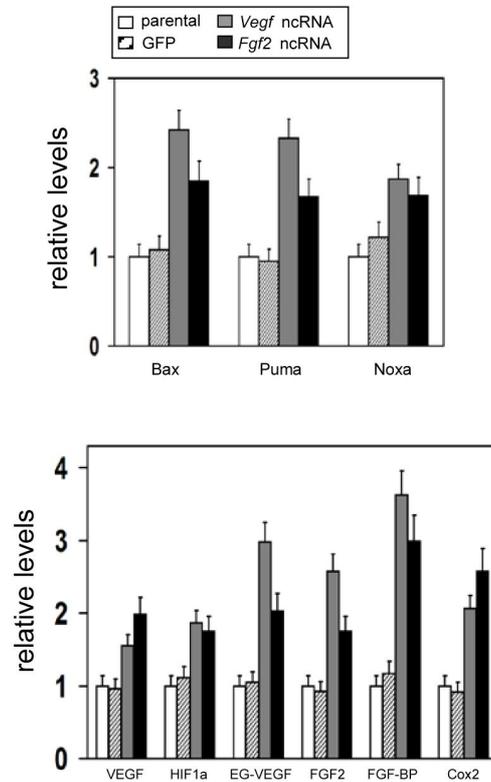


図3 各ncRNAによるp53標的遺伝子発現の亢進

これら in vitro での悪性形質化に一致して、ヌードマウス皮下移植腫瘍は、造腫瘍能がコントロールの4倍以上に亢進していた。さらに、アバスチン、5-FUに対する抵抗性を示した。腫瘍を免疫組織科学的に解析した結果、アバスチン処理をしたにも関わらずアポトーシス細胞が著しく少なく (図5)、一方、腫瘍新生血管が多い結果となった (図5)。

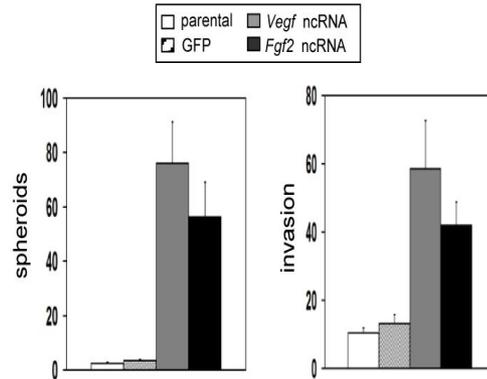


図4 各ncRNAによる悪性形質化 (in vitro)

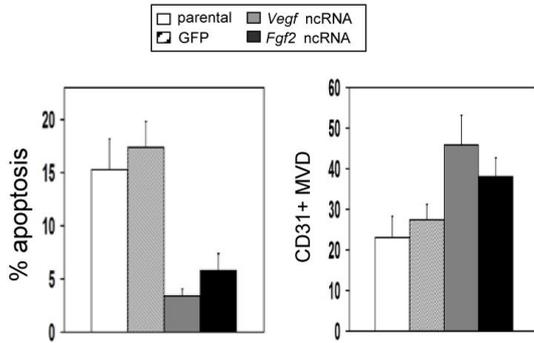


図5 各ncRNAによる悪性軽質化 (in vivo)

(4) VEGF 阻害薬、Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA が、腫瘍間質細胞に及ぼす影響

がん細胞は間質細胞の p53 不活性化・喪失を誘導する。また、間質細胞は VEGF 受容体を発現していることから、VEGF 標的阻害剤によって VEGF が欠乏すると、がん細胞同様、p53 のサイレンシングが誘導される可能性がある。その結果、正常間質細胞から腫瘍促進性の間質細胞に変化すると考えられる。そこで、ヒト間質細胞を用いて、腫瘍間質細胞における p53 のサイレンシングを検討した。

ヒト正常間質細胞 (血管内皮細胞および繊維芽細胞) に VEGF 標的阻害剤 (アバスタチン、VEGF 受容体阻害剤)、低酸素ストレスを処理しても、Vegf ncRNA、Fgf-2 ncRNA の誘導は起こらず、その結果 p53 発現の抑制は見られなかった。

Vegf ncRNA、Fgf-2 ncRNA を強制発現させた間質細胞 (血管内皮細胞および繊維芽細胞) は、遊走能の亢進と、低酸素誘導性のアポトーシスに抵抗性を示した。

(5) ヒト腫瘍組織での Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の発現解析

大腸がん組織 (原発巣) における Vegf ncRNA の発現は、化学療法単独群でも増加し、アバスタチン治療群ではさらに著増していた (図 6)。Fgf2 ncRNA の発現は、化学療法単独群及びアバスタチン治療群で増加していた (図 6)。一方、未治療群では、こらら ncRNA の発現は見られなかった (図 6)。

肝転移巣においても、アバスタチン治療群で Vegf ncRNA と Fgf2 ncRNA の発現が見られた (図 7)。

(6) ヒト腫瘍組織内の腫瘍間質細胞における Vegf ncRNA と Fgf-2 ncRNA の発現解析

アバスタチン治療群の大腸がん組織内の CD31 陽性がん関連血管内皮細胞において、

Vegf ncRNA と Fgf2 ncRNA の発現が見られた (図 8)。一方、未治療群のがん関連血管内皮細胞では、Vegf ncRNA と Fgf2 ncRNA の発現は見られなかった。

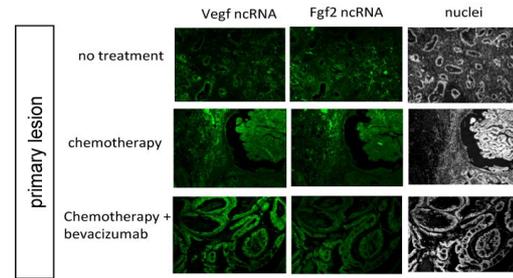


図6 大腸がん原発巣における各ncRNAの発現

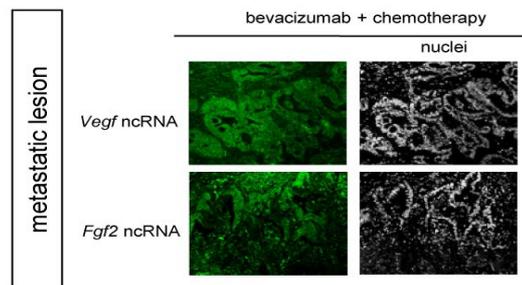


図7 大腸がん転移巣(肝)における各ncRNAの発現

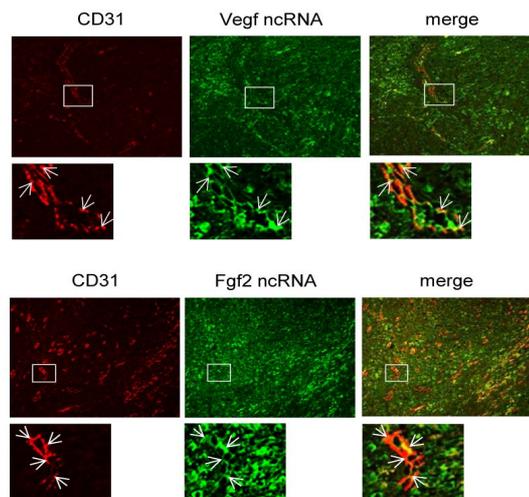


図8 腫瘍間質細胞における各ncRNAの発現

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Abe T, Hirasaka K, Kohno S, Ochi A, Yamagishi N, Ohno A, Teshima-Kondo S, Nikawa T. Ubiquitin ligase Cbl-b and obesity-induced insulin resistance. *Endocr J.* 2014 [Epub ahead of print] 査読有

Teshima-Kondo, S. and Nikawa, T. Regulation of skeletal muscle atrophy. *J. Physic. Fitness Sports*

Med. 2 (4): 457-462 (2013). 査読有
Yamagishi, N., Teshima-Kondo, S.
(corresponding author), Masuda, K., Nishida, K.,
Kuwano, Y., Nikawa, T., and Rokutan, K.
Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF
enhances the malignant phenotype of colorectal
cancer cells. BMC Cancer. 13:229 (2013).doi:
10.1186/1471-2407-13-229. 査読有
Hirasaka K, Maeda T, Ikeda C, Haruna M, Kohno
S, Abe T, Ochi A, Mukai R, Oarada M,
Teshima-Kondo, S., Ohno A, Okumura Y, Terao J,
Nikawa T. Isoflavones Derived from Soy Beans
Prevent MuRF1-Mediated Muscle Atrophy in
C2C12 Myotubes through SIRT1 Activation. J
Nutr Sci Vitaminol. 59(4):317-324, 2013. 査
読有
Abe T, Kohno S, Yama T, Ochi A, Suto T,
Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S.,
Okumura Y, Oarada M, Choi I, Mukai R, Terao J,
Nikawa T. Soy Glycinin Contains a Functional
Inhibitory Sequence against Muscle Atrophy
-Associated Ubiquitin Ligase Cbl-b. Int J
Endocrinol. 2013:907565 (2013). doi:
10.1155/2013/907565 査読有
Abe T, Hirasaka K, Kagawa S, Kohno S, Ochi A,
Utsunomiya K, Sakai A, Ohno A,
Teshima-Kondo S., Okumura Y, Oarada M,
Maekawa Y, Terao J, Mills EM, Nikawa T. Cbl-b
Is a Critical Regulator of Macrophage Activation
Associated with Obesity-Induced Insulin
Resistance in Mice. Diabetes. 62(6):1957-1969.
(2013) doi: 10.2337/db12-0677 査読有
Utsunomiya K, Owaki K, Okumura Y, Yano M,
Oto T, Suzuki E, Tamura S, Abe T, Kohno S,
Ohno A, Hirasaka K, Teshima-Kondoh S.
Nikawa T. An Intracellular Fragment of
Osteoactivin Formed by Ectodomain Shedding
Translocated to the Nucleoplasm and Bound to
RNA Binding Proteins. Biosci Biotechnol
Biochem. 76(12):2225-2229 (2012). 査読有
Kohno S, Yamashita Y, Abe T, Hirasaka K,
Oarada M, Ohno A, Teshima-Kondo S.,
Higashibata A, Choi I, Mills EM, Okumura Y,
Terao J, Nikawa T. Unloading stress disturbs
muscle regeneration through perturbed
recruitment and function of macrophages. J Appl
Physiol. 112(10):1773-1782 (2012). doi:
10.1152/jappphysiol.00103.2012. 査読有

[学会発表](計 11 件)

永野ひかる、平野俊介、山岸直子、数藤拓郎、
富田知里、真板綾子、平坂勝也、二川健、近藤茂忠、IRS-1 遺伝子産物による骨格筋細胞
の分化制御、第 36 回日本分子生物学会年会、
2013.12.3-6、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
平野俊介、永野ひかる、山岸直子、数藤拓郎、
富田知里、安倍知紀、宇都宮健郎、越智あり
さ、真板綾子、二川健、近藤茂忠 IRS-1 転
写産物による骨格筋の分化制御、第 46 回日本
栄養・食糧学会中国・四国支部大会、
2013.11.16、山口県立大学(山口県山口市)
山岸直子、近藤茂忠、増田清士、桑野由紀、六
反一仁、二川健、Identification of a novel
non-coding RNA encodes in the Vegf gene,
Cell Symposia Functional RNAs, 2012.12.2-4,
Hotel Melia Sitges(バルセロナ、スペイン)
近藤茂忠、山岸直子 新規腫瘍促進性ノンコー
ディング RNA の発現制御、第 71 回日本癌学
会学術集会、2012. 9.20.-21.

ロイトン札幌(北海道札幌市)
山岸直子、近藤茂忠 Vegf 遺伝子にコードさ
れた新規腫瘍促進性ノンコーディング RNA の
機能解析、第 71 回日本癌学会学術集会、2012.
9.20.-21. ロイトン札幌(北海道札幌市)
近藤茂忠、IRS-1 遺伝子を介した筋萎縮スト
レス応答の分子機構、第 13 回運動器科学研究
会、2012.9.14-15、アピカルイン京都(京都
府京都市)
永野ひかる、近藤茂忠、河野尚平、坂井敦子、
安倍知紀、宇都宮健郎、越智ありさ、上地達
也、上村啓太、池田千佳、後藤春樹、山下結
衣、坂東亜紀、前田翼、数藤拓郎、真板綾子、
平坂勝也、奥村裕司、二川健、IRS-1 遺伝子
産物による骨格筋細胞の脱分化、第 66 回日本
栄養・食糧学会大会、2012.5.18-24、東北大
学川内北キャンパス(宮城県仙台市)
近藤茂忠、山岸直子 Identification of a
novel tumor promoting non-coding RNA
encoded in the Vegf gene. Cell Symposia:
Regulatory RNAs 2011.10.11. Chicago (USA)
二川健、河野尚平、山下結衣、安倍知紀、平
坂勝也、真板綾子、近藤茂忠、寺尾順次、奥
村裕司、Unloading stress disturbs muscle
regeneration through perturbed recruitment
and function of macrophage, FASEB Science
Research Conference on Skeletal Muscle
Satellite and Stem Cell, 2012.8.12-17, Il
Ciocco (ルッカ、イタリア)
山岸直子、近藤茂忠、増田清士、桑野由紀、
西田憲生、六反一仁 VEGF 遺伝子にコードさ
れた腫瘍促進性 non-coding RNA の発現制御機
構、第 34 回日本分子生物学会年会、2011.
12.13. - 16., パシフィコ横浜(神奈川県横浜
市)
河野尚平、近藤茂忠、平坂勝也、真板綾子、
奥村裕司、中尾玲子、東端晃、東谷篤志、二
川健、廃用性筋萎縮の発生機序~オミクス技
術を用いた無重力応答因子の探索、第 65 回日
本栄養・食糧学会大会、2011.5.13-15、お茶
の水女子大学(東京都)

[産業財産権]

取得状況(計 1 件)

名称: p 5 3 の発現促進方法およびそれに
用いる p 5 3 発現促進剤

発明者: 近藤茂忠、六反一仁

権利者: 国立大学法人徳島大学

種類: 特許

番号: 特許第 5273740 号

取得年月日: 平成 25 年 5 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤茂忠 (KONDO, Shigetada)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究
部・准教授

研究者番号: 40304513

(2) 研究分担者

該当なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

桑野 由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究
部・助教

研究者番号: 00563454